

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 02 SEP 2003

WIPO PCT

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:**

102 30 875.6

**Anmeldetag:**

9. Juli 2002

**Anmelder/Inhaber:**

Morphochem AG Aktiengesellschaft für kombina-  
torische Chemie, München/DE

**Bezeichnung:**

Tubulysin-Biokonjugate

**IPC:**

A 61 K 38/05

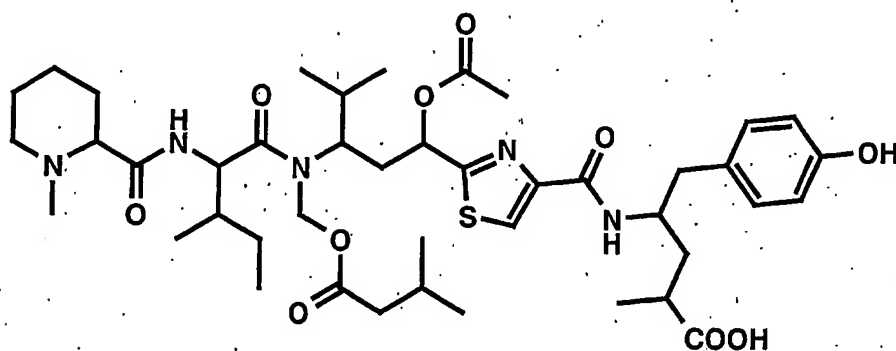
Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. Mai 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Hiebinger

### Zusammenfassung

Die Vorliegende Erfindung betrifft neue Tubulysin-Biokonjugate, insbesondere Antikörper-Konjugate (z. B. von Tubulysin A) sowie deren Verwendung zur Behandlung von Krebserkrankungen.

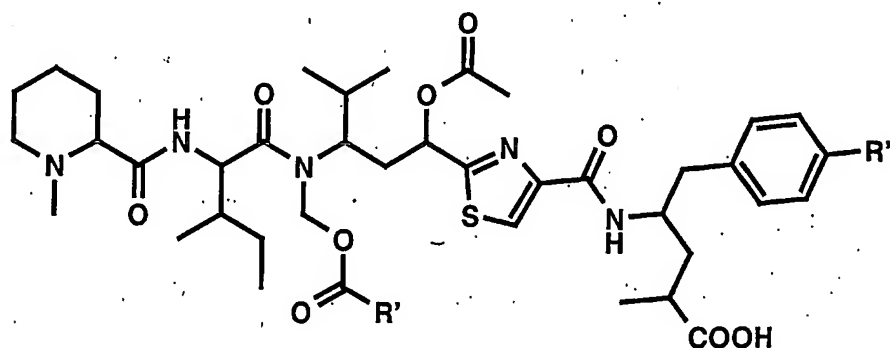


Tubulysin A

# Tubulysin-Biokonjugate

Die Vorliegende Erfindung betrifft neue Tubulysin-Biokonjugate, insbesondere Antikörper-Konjugate sowie deren Verwendung zur Behandlung von Krebserkrankungen.

Die Tubulysine wurden erstmals von der Gruppe von Höfle und Reichenbach (GBF Braunschweig) aus einer Kulturbrühe von Stämmen des Myxobakteriums *Archangium gephyra* isoliert (F. Sasse et al. J. Antibiot. 2000, 53, 879-885; WO9813375; DE 10008089). Diese Verbindungen haben eine ausgesprochen hohe cytotoxische Aktivität gegenüber Säugetierzelllinien mit  $IC_{50}$ -Werten im picomolaren Bereich und sind daher als potentielle Krebsmedikamente von grossem Interesse.



Tubulysin A:  $R' = CH_2CH(CH_3)_2$ ;  $R'' = OH$

Tubulysin B:  $R' = CH_2CH_2CH_3$ ;  $R'' = OH$

Tubulysin C:  $R' = CH_2CH_3$ ;  $R'' = OH$

Tubulysin D:  $R' = CH_2CH(CH_3)_2$ ;  $R'' = H$

Tubulysin E:  $R' = CH_2CH_2CH_3$ ;  $R'' = H$

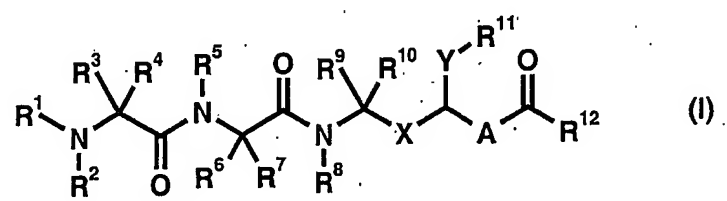
Tubulysin F:  $R' = CH_2CH_3$ ;  $R'' = H$

Die extrem hohe Cytotoxizität der Tubulysine bringt aber auch einige Nachteile mit sich: eine hohe allgemeine Toxizität sowie eine geringe Selektivität gegenüber normalen Zellen. Eine Möglichkeit, diese Nachteile zu  
5 umgehen, besteht in der Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen Tumorzellantigene als Transportmittel, die im Körper bevorzugt Krebszellen ansteuern und gesundes Gewebe schonen.

10 Ziel der vorliegenden Erfindung war es, neuartige Tubulysin-Biokonjugate, insbesondere Tubulysin-Antikörper-Konjugate bereitzustellen, die bessere pharmakologische Eigenschaften, vor allem eine höhere Selektivität bei bestehender Cytotoxizität sowie eine  
15 geringere Toxizität, als die Naturstoffe aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft Biokonjugate der allgemeinen Formel U-V-W, wobei,

20 U die Formel (I) aufweist,



wobei

25

A ein gegebenenfalls substituierter 5- oder 6-gliedriger Heteroaromat ist;

X ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom, eine Gruppe der Formel  $\text{NR}^{13}$  oder  $\text{CR}^{14}\text{R}^{15}$  ist;

Y ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe  
5 der Formel  $\text{NR}^{16}$  ist und

die Reste  $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5, \text{R}^6, \text{R}^7, \text{R}^8, \text{R}^9, \text{R}^{10}, \text{R}^{11}, \text{R}^{12}, \text{R}^{13}, \text{R}^{14}, \text{R}^{15}$  und  $\text{R}^{16}$  unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, ein Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-,  
10 Heteroalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Cycloalkyl-, Alkylcycloalkyl-, Heteroalkylcycloalkyl-, Heterocycloalkyl-, Aralkyl- oder ein Heteroaralkylrest, oder zwei der Reste gemeinsam Teil eines Cycloalkyl- oder Heterocycloalkylringsystems sind,

15 V ein Linker und W ein Biomolekül ist.

Der Ausdruck Alkyl bezieht sich auf eine gesättigte, geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe, die  
20 1 bis 50 Kohlenstoffatome, vorzugsweise 1 bis 12 Kohlenstoffatome, besonders bevorzugt 1 bis 6 Kohlenstoffatome aufweist, z.B. die Methyl-, Ethyl-, Isopropyl-, Isobutyl-, tert-Butyl-, n-Hexyl-, 2,2-Dimethylbutyl-, n-Octyl-, Allyl-, Isoprenyl- oder  
25 Hex-2-enyl-Gruppe.

Die Ausdrücke Alkenyl und Alkynyl beziehen sich auf zumindest teilweise ungesättigte, geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppen, die 2 bis 50  
30 Kohlenstoffatome, vorzugsweise 2 bis 12 Kohlenstoffatome, besonders bevorzugt 2 bis 6 Kohlenstoffatome aufweisen, z. B. die Allyl-, Acetylenyl-, Propargyl-, Isoprenyl- oder Hex-2-enyl-Gruppe.

Der Ausdruck Heteroalkyl bezieht sich auf eine Alkyl-, eine Alkenyl- oder eine Alkynyl-Gruppe, in der ein oder mehrere (bevorzugt 1, 2, 3, 4 oder 5) Kohlenstoffatome durch ein Sauerstoff-, Stickstoff-, Phosphor- oder Schwefelatom ersetzt sind (bevorzugt Sauerstoff oder Stickstoff), z.B. eine Alkyloxy-Gruppe wie z.B. Methoxy oder Ethoxy, oder eine Methoxymethyl-, Nitril-, Methylcarboxyalkylester-, Carboxyalkylester- oder 2,3-Dioxyethyl-Gruppe. Der Ausdruck Heteroalkyl bezieht sich des weiteren auf eine Carbonsäure oder eine von einer Carbonsäure abgeleitete Gruppe wie z. B. Acyl, Acyloxy, Carboxyalkyl, Carboxyalkylester z.B. Methyl-carboxyalkylester, Carboxyalkylamid, Alkoxycarbonyl oder Alkoxycarbonyloxy.

Der Ausdruck Cycloalkyl bzw. Cyclo- bezieht sich auf eine gesättigte oder teilweise ungesättigte cyclische Gruppe, die einen oder mehrere Ringe aufweist, die ein Gerüst bilden, welches 3 bis 14 Kohlenstoffatome, vorzugsweise 3 bis 10 Kohlenstoffatome enthält, z.B. die Cyclopropyl-, Cyclohexyl-, Tetralin- oder Cyclohex-2-enyl-Gruppe.

Der Ausdruck Heterocycloalkyl bzw. Heterocyclo bezieht sich auf eine Cycloalkylgruppe wie oben definiert, in der ein oder mehrere (bevorzugt 1, 2 oder 3) Kohlenstoffatome durch ein Sauerstoff-, Stickstoff-, Phosphor- oder Schwefelatom ersetzt sind und kann beispielsweise für die Piperidin-, Morpholin-, N-Methylpiperazin- oder N-Phenylpiperazin-Gruppe stehen.

Die Ausdrücke Alkylcycloalkyl bzw. Heteroalkylcycloalkyl beziehen sich auf Gruppen, die entsprechend den obigen

Definitionen sowohl Cycloalkyl- bzw. Heterocycloalkyl- wie auch Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl- und/oder Heteroalkylgruppen enthalten.

- 5 Der Ausdruck Aryl bzw. Ar. bezieht sich auf eine aromatische Gruppe, die einen oder mehrere Ringe hat, und durch ein Gerüst gebildet wird, das 5 bis 14 Kohlenstoffatome, vorzugsweise 5 oder 6 bis 10 Kohlenstoffatome enthält z.B. eine Phenyl-, Naphthyl-, 2-, 3- oder 4-Methoxyphenyl-, 2-, 3- oder 4-Ethoxyphenyl-, 4-Carboxyphenylalkyl- oder 4-Hydroxyphenyl-Gruppe.

- 15 Der Ausdruck Heteroaryl bzw. Heteroaromat bezieht sich auf eine Aryl-Gruppe, in der ein oder mehrere (bevorzugt 1, 2 oder 3) Kohlenstoffatome durch ein Sauerstoff-, Stickstoff-, Phosphor- oder Schwefelatom ersetzt sind, z.B. die 4-Pyridyl-, 2-Imidazolyl-, 3-Pyrazolyl- und Isochinolinyl-Gruppe.

- 20 Die Ausdrücke Aralkyl bzw. Heteroaralkyl beziehen sich auf Gruppen, die entsprechend den obigen Definitionen sowohl Aryl- bzw. Heteroaryl- wie auch Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl- und/oder Heteroalkyl- und/oder Cycloalkyl- und/oder Heterocycloalkylgruppen enthalten, z.B. die 25 Tetrahydroisochinolinyl-, Benzyl-, 2- oder 3-Ethylindolyl- oder 4-Methylpyridino-Gruppe.

- Die Ausdrücke Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Cycloalkyl-, Heterocycloalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- und Heteroaralkyl beziehen sich auch auf Gruppen, in 30 denen ein oder mehrere Wasserstoffatome solcher Gruppen durch Fluor-, Chlor-, Brom- oder Jodatome oder OH, SH, NH<sub>2</sub> oder NO<sub>2</sub>-Gruppen ersetzt sind. Diese Ausdrücke beziehen

sich weiterhin auf Gruppen, die mit unsubstituierten Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Cycloalkyl-, Heterocycloalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkyl-Gruppen substituiert sind.

5

Der Ausdruck Linker bezieht sich auf eine Gruppe, die dazu verwendet wird, Verbindungen der Formel (I) mit einem Biomolekül zu verbinden. Ein Linker kann eine direkte Bindung, eine Alkylen-, Alkenylen-, Alkinylen-, Heteroalkylen-, Arylen-, Heteroarylen-, Cycloalkylen-, Alkylcycloalkylen-, Heteroalkylcycloalkylen-, Heterocycloalkylen-, Aralkylen- oder eine Heteroaralkylengruppe sein. Bevorzugt ist der Linker metabolisch spaltbar. Besonders bevorzugt enthält der Linker ein oder mehrere Hydrazon- und/oder Disulfidgruppen.

10  
15

Als Biomoleküle kommen z. B. Glycoproteine, Lipoproteine, Lectine, Hormone, Albumin, Liposome, DNA, Dextran, Biotin, Streptavidin, Avidin, Zellen oder Antikörper in Frage. Bevorzugt ist das Biomolekül ein Antikörper; besonders bevorzugt ein monoklonaler Antikörper.

20

Weitere Beispiele für Linker und Biomoleküle sind in G. T. Hermanson, Biokonjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996 beschrieben.

25

Verbindungen der Formel (I) können aufgrund ihrer Substitution ein oder mehrere Chiralitätszentren enthalten. Die vorliegende Erfindung umfasst daher sowohl alle reinen Enantiomere und alle reinen Diastereomere, als auch deren Gemische in jedem Mischungsverhältnis.

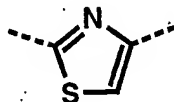
30

Bevorzugt ist X eine CH<sub>2</sub>-Gruppe.



Wiederum bevorzugt ist Y ein Sauerstoffatom.

Weiter bevorzugt weist A die folgende Struktur auf:



5

Des weiteren bevorzugt sind  $R^1$  und  $R^3$  zusammen Teil eines Cycloalkylrings; besonders bevorzugt weisen  $R^1$  und  $R^3$  zusammen die Formel  $-(CH_2)_4-$  auf.

10

Weiter bevorzugt ist  $R^2$  eine  $C_1$ - $C_4$  Alkylgruppe, besonders bevorzugt eine Methylgruppe.

Des weiteren bevorzugt sind  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  und  $R^{10}$  Wasserstoffatome.

15

Wiederum bevorzugt ist  $R^7$  eine Alkylgruppe; besonders bevorzugt eine Gruppe der Formel  $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ .

20

Des weiteren bevorzugt ist  $R^8$  ein Wasserstoffatom, eine Alkyl-, Alkenyl- oder eine Heteroalkylgruppe; besonders bevorzugt eine Gruppe der Formel  $-CH_2OC(=O)R^{17}$ , wobei  $R^{17}$  eine  $C_1$ - $C_6$  Alkyl- oder eine  $C_1$ - $C_6$  Alkenylgruppe ist.

25

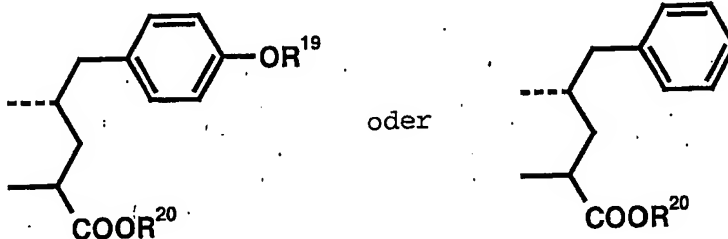
Wiederum bevorzugt ist  $R^9$  eine Alkylgruppe; besonders bevorzugt eine Gruppe der Formel  $-CH(CH_3)_2$ .

Weiter bevorzugt ist  $R^{11}$  ein Wasserstoffatom oder eine Acetylgruppe.

30

Weiter bevorzugt ist  $R^{12}$  eine Gruppe der Formel  $NHR^{18}$ , wobei  $R^{18}$  eine Heteroaralkylgruppe ist.

Des weiteren bevorzugt weist  $R^{18}$  die folgenden Strukturen auf:



wobei  $R^{19}$  und  $R^{20}$  unabhängig voneinander Wasserstoffatome, Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Cycloalkyl-, Alkylcycloalkyl-, Heteroalkylcycloalkyl-, Heterocycloalkyl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylgruppen sind; besonders bevorzugt sind  $R^{19}$  und  $R^{20}$  Wasserstoffatome.

Besonders bevorzugt ist die Verbindung der Formel (I) Tubulysin A.

Weiter bevorzugt ist der Linker über die Reste  $R^8$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{19}$  oder  $R^{20}$  an Verbindungen der Formel (I) gebunden; besonders bevorzugt über  $R^{19}$  oder  $R^{20}$ .

Pharmakologisch akzeptable Salze, Solvate, Hydrate oder Formulierungen der hier beschriebenen Biokonjugate sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Beispiele für pharmakologisch akzeptable Salze der Verbindungen der Formel (I) sind Salze von physiologisch akzeptablen Mineralsäuren wie Salzsäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure oder Salze von organischen Säuren wie

Methansulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Milchsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Trifluoressigsäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure und Salicylsäure. Verbindungen der Formel (I) können solvatisiert, insbesondere hydratisiert sein. Die Hydratisierung kann z.B. während des Herstellungsverfahrens oder als Folge der hygroskopischen Natur der anfänglich wasserfreien Verbindungen der Formel (I) auftreten.

10 Die pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten mindestens eine Verbindung der Formel (I) als Wirkstoff und fakultativ Trägerstoffe und/oder Adjuvantien.

15 Die therapeutische Verwendung der Verbindungen der Formel (I), ihrer pharmakologisch akzeptablen Salze bzw. Solvate und Hydrate sowie Formulierungen und pharmazeutischen Zusammensetzungen liegt ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

20 Auch die Verwendung dieser Wirkstoffe zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krebserkrankungen ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Des weiteren sind die vorliegenden Verbindungen bei der Vorbeugung und/oder  
25 Behandlung von rheumatoider Arthritis, entzündlichen Erkrankungen, Immunologisch bedingten Krankheiten (z. B. Diabetes Typ 1), Autoimmunkrankheiten sowie weiteren Tumorerkrankungen von großem Interesse. Im allgemeinen werden Verbindungen der Formel (I) unter Anwendung der  
30 bekannten und akzeptablen Modi, entweder einzeln oder in Kombination mit einem beliebigen anderen therapeutischen Mittel verabreicht. Solche therapeutisch nützlichen Mittel werden bevorzugt parenteral, z.B. als injizierbare

Lösung verabreicht. Zur Herstellung von flüssigen Lösungen kann man Arzneimittelträgerstoffe wie z.B. Wasser, Alkohole oder wäßrige Salzlösungen verwenden. Die pharmazeutisch verwendbaren Mittel können auch  
5 Zusatzstoffe zur Konservierung, Stabilisierung, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer und Antioxidantien enthalten.

Kombinationen mit anderen therapeutischen Mitteln können  
10 weitere Wirkstoffe beinhalten, die gewöhnlich zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt werden.

**BOOK REVIEW**

- 5 U die Formel (I) aufweist,



10.

15

20

25

Heterocyclo-alkyl-, Aralkyl- oder ein  
Heteroaralkylrest, oder zwei der Reste gemeinsam  
Teil eines Cycloalkyl- oder  
Heterocycloalkylringsystems sind,

V ein Linker und W ein Biomolekül ist.

2. Biokonjugate nach Anspruch 1, wobei die Verbindung  
5 der Formel (I) Tubulysin A ist.
3. Biokonjugate nach Anspruch 1 oder 2, wobei das  
Biomolekül ein Antikörper ist.
- 10 4. Biokonjugate nach Anspruch 1 oder 2, wobei das  
Biomolekül ein monoklonaler Antikörper ist.
- 15 5. Verwendung eines Biokonjugats nach einem der  
Ansprüche 1 bis 4 zur Behandlung von  
Krebserkrankungen.